

# METHOD FOR MEASURING PROTEIN DERIVED FROM ALVEOLAR BONE

Reference 5

Patent number: JP6289020  
Publication date: 1994-10-18  
Inventor: HOSODA KENJI; EGUCHI HIROSHI; KUBOTA TAKAAKI; NAKAMOTO TADAKATSU  
Applicant: TEIJIN LTD  
Classification:  
- international: G01N33/53; A61K49/00  
- european:  
Application number: JP19930079439 19930406  
Priority number(s): JP19930079439 19930406

[View INPADOC patent family](#)

---

## Abstract of JP6289020

**PURPOSE:** To properly predict an activity period or to perform an extremely early diagnosis with one inspection by using gum groove liquid as a specimen sample. **CONSTITUTION:** Gum groove liquid is used as a specimen sample. When extracting the liquid from an adsorbed sample using an extraction liquid, ultrasonic wave, natural dipping, or agitation may be used. The liquid from the gum groove liquid can be sampled by a film-shaped, fiber-shaped, or capillary-shaped object. For example, nitrocellulose film, cellulose, a filter paper, perio paper, a twisted filter paper, nylon film, etc., may be used as the film-shaped object, fiber-shaped object, or capillary object. Also, the extraction is performed by a liquid solution containing protein/nonionics. The liquid solution containing the protein constituent/nonionics can be obtained by dissolving, for example, the protein constituents, etc., into a water-based medium such as a buffer liquid.

Reference 5

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-289020

(43) 公開日 平成6年(1994)10月18日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	D	8310-2 J		
A 6 1 K 49/00	Z	9051-4 C		

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平5-79439

(22) 出願日 平成5年(1993)4月6日

(71) 出願人 000003001  
帝人株式会社  
大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

(72) 発明者 細田 健治  
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 江口 広志  
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 窪田 貴明  
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内

(74) 代理人 弁理士 前田 純博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯槽骨由来タンパクの測定方法

(57) 【要約】

【目的】 歯周症の診断に有用な歯槽骨由来タンパクの測定方法を提供する。

【構成】 歯槽骨由来タンパクの免疫学的測定方法であって、検体試料として歯肉溝滲出液を用いることを特徴とする歯槽骨由来タンパクの測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 歯槽骨由来タンパクの免疫学的測定方法であって、検体試料として歯肉溝滲出液を用いることを特徴とする歯槽骨由来タンパクの測定方法。

【請求項2】 該歯槽骨由来タンパクが、オステオカルシン、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TR-ACP）、オステオポンチン、TGF- $\beta$ 、TGF-I、及びTGF-IIから選ばれる少なくとも1以上の歯槽骨由来タンパクである請求項1記載の測定方法。

【請求項3】 該免疫学的測定方法が、ラテックス凝集法、サンドイッチ免疫測定法、及び競合的免疫測定法から選ばれるいずれかである請求項1記載の測定方法。

【請求項4】 該免疫学的測定方法が、抗歯槽骨由来タンパク抗体を不溶性担体に固定した固定抗体を用いる方法であって、該不溶性担体が繊維状物である請求項1記載の測定方法。

【請求項5】 該不溶性担体が、金コロイドである請求項4記載の測定方法。

【請求項6】 請求項1記載の測定方法を用いて歯槽骨由来タンパクを測定し、得られた測定値に基いて歯周疾患の治癒効果を判定する方法。

【請求項7】 歯肉溝滲出液から歯槽骨由来タンパクを抽出することを特徴とする歯槽骨由来タンパクの抽出方法。

【請求項8】 該滲出液が、膜、繊維状物、又はキャピラリー状物によって採取されたものである請求項7記載の抽出方法。

【請求項9】 該抽出が、タンパク成分0.005重量%以上及び/又は非イオン系界面活性剤0.005重量%以上を含有する溶液を用いるものである請求項7記載の抽出方法。

【請求項10】 該溶液のpHが6.0~8.5の範囲である請求項9記載の抽出方法。

【請求項11】 該タンパク成分が、スキムミルクである請求項9記載の抽出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、歯槽骨由来タンパクの測定方法、及び歯肉溝滲出液から歯槽骨由来タンパクの抽出方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 歯周疾患は、歯の支持体を失わせるという意味で、重要な疾患である。最近の研究によると、歯周疾患における歯周組織破壊は、個々の部位において比較的短期間に起こり、その後は長期間の非活動期が続くことが示され、歯周疾患は、部位特異的に活動期と休止期を繰返しながら進行していく炎症性疾患であるという概念が受け入れられるようになってきた。

【0003】 従来の上記の疾患に関する診断法として、歯周炎指数（GI）、プロービング時の出血、ポケット

の深さ（PD）、アタッチメントレベル（AL）、デンタルX線写真などの種々の臨床パラメーターを用いて歯周疾患の診査ならびに診断を行なっている。すなわち同一部位に対し、最低2つの時点における臨床パラメーターを測定して、その変化量を求めて、評価を行なうが、この方式では活動期病変であったという結果を知るだけの可能性が高く、活動期を予知、あるいは早期診断することはできない。

【0004】 上記の欠点をおぎなうために、歯肉溝滲出液中の物質をはかり、歯周疾患の評価を行なう研究がある。例えば、 $\beta$ グルクロニダーゼ（文献1）、プロスタグランジンE<sub>2</sub>（文献2）、プロテアーゼ、フラゲナーゼ、ヒアルノニダーゼである。

【0005】 しかしながら、これらは、細菌やそれらを排除するべく出現した宿主側の炎症関連細胞由来の物質であり、真の歯周疾患の病勢を表わしているとはいいがたかった。

## 【0006】

【発明を解決しようとする課題】 このような点から、1回の検査によって、活動期を適確に予知、あるいは極めて早期に診断できるような検査方法が望まれていた。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決すべく、歯肉溝滲出液の骨由来タンパクを採取し、効率よく抽出し、高感度に測定することにより、歯周疾患の診断や治療効果判定に有用であることを見出し、本発明に到達した。

【0008】 すなわち本発明は、歯槽骨由来タンパクの免疫学的測定方法であって、検体試料として歯肉溝滲出液を用いることを特徴とする歯槽骨由来タンパクの測定方法である。

【0009】 さらに本発明は、上記の測定方法を用いて歯槽骨由来タンパクを測定し、得られた測定値に基いて歯周疾患の治癒効果を判定する方法、及び歯肉溝滲出液から歯槽骨由来タンパクを抽出することを特徴とする歯槽骨由来タンパクの抽出方法である。

【0010】 本発明の抽出方法において、歯肉溝滲出液からの滲出液は、膜状、繊維状物、又はキャピラリー状物によって採取することができる。

【0011】 かかる膜状、繊維状物、又はキャピラリー状物としては、例えばニトロセルロース膜、セルロース、濾紙、ペリオペーパー、濾紙のこより状物、ナイロン膜、PDGF膜、プラスチックのキャピラリー、グラスファイバー紙、レーヨン繊維、ガラス繊維、わた等があげられる。また、この抽出は、タンパク及び/又は非イオン系界面活性剤を含有する溶液を用いて抽出することができる。

【0012】 かかるタンパク成分としては、例えばアルブミン、オロソムコイド、ペプシン、カゼイン、 $\gamma$ -グロブリン、卵アルブミン、ヘモシアニン等があげられ

る。非イオン系界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、脂肪酸アルキロールアマイド、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル、ポリオキシエチレンアルキルアミン等があげられる。

【0013】タンパク成分を含有する溶液を抽出液とする場合には、0.005重量%以上、好ましくは0.01~20重量%を挙げることができる。0.005重量%未満では被抽出蛋白の不安定さで好ましくなく、また20重量%を超えると抽出効率の点で好ましくない。タンパク成分がスキムミルクである場合には、0.005重量%以上が好ましく、上限は1.0重量%が好ましい。また、非イオン系界面活性剤を含有する溶液を抽出液とする場合には、0.005重量%、好ましくは0.01~2重量%を挙げることができる。0.005重量%未満では抽出効率が悪く好ましくなく、また2重量%を超えると抽出された蛋白の不安定性等の理由で好ましくない。

【0014】タンパク成分及び／又は非イオン系界面活性剤を含有する溶液は、例えばタンパク成分等を緩衝液等の水性媒体に溶解することによって得られる。

【0015】かかる水性媒体としては、例えばリン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝液、ヘペス緩衝液、炭酸緩衝液等が挙げられ、なかでも、トリス緩衝液が好ましい。

【0016】このタンパク成分等を含有する溶液のpHは6.0~8.5の範囲が好ましい。6.0未満あるいは8.5を超える条件では歯槽骨由来蛋白の抽出効率がおちるため好ましくない。

【0017】本発明の測定方法においては、検体試料として、このような歯肉溝滲出液を用いる。滲出液を吸着した試料から、抽出液を用いて抽出する場合、超音波をもいいてもよいし、自然浸漬でもよいし、攪拌してもよい。

【0018】本発明の骨由来タンパクとしては、オステオカルシン、TR-ACP、オステオポンチン、TGF- $\beta$ 、IGF-I、IGF-IIなどから選ばれる少なくとも1以上のタンパクが挙げられる。これらのなかでもオステオカルシンが好ましい。

【0019】本発明の免疫学的測定方法としては、例えばサンドイッチ免疫測定法、ラテックス凝集法、競合的免疫測定法等を挙げることができる。

【0020】これらの免疫学的測定方法は、いずれも従来公知の測定方法であり、例えば「酵素免疫測定法」(石川栄治著)等にその方法が記載されている。

【0021】具体的にサンドイッチ免疫測定法で、標識物質として酵素を用いる方法(EIA)について本発明の測定方法を実施する場合を説明する。このサンドイッチ法によるEIAにおいては、本発明の歯槽骨由来タンパクに対する抗体を通常2種用い、例えば次のような手

順に従い定量する。すなわち、2種の抗体のうちの一方の抗体(第1抗体)を適当な不溶性担体(例えばプラスチック容器)に固定化する(以下これを“固定化抗体”という)。次いで不溶性担体と測定しようとする試薬又は検体試料との非特異的結合を避けるために適当な物質(例えば牛血清アルブミン)で不溶性担体の表面を被覆する。このようにして得られた第1抗体が固定化された不溶性担体を検体試料と一定時間及び温度で接触させ反応させる。この間に固定化工程(第1抗体)と検体試料中の歯槽骨由来タンパクが結合する。次いで不溶性担体を適当な洗浄液で洗った後、適当な酵素標識した歯槽骨由来タンパクに対する他方の抗体(第2抗体)の溶液(例えば水溶液)と一定時間及び温度で接触させ、固体化抗体に結合した歯槽骨由来タンパクと第2抗体を反応させる。これを適当な洗浄液で洗い、次いで不溶性担体上の固体化抗体と歯槽骨由来タンパクを介して結合して存在する第2抗体に標識された標識物質の量を測定する。

【0022】なお上記サンドイッチ法は、固定化抗体、標識抗体及び歯槽骨由来タンパクを含有する検体試料を同時に混合し、一定時間及び温度でこれら三者を同時に接触させ反応させて行うこともできる。

【0023】かくしてその値から検体試料中の歯槽骨由来タンパクの量を算出することができる。通常、サンドイッチ法では、第1抗体と第2抗体とが双方ともモノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよいし、一方をモノクローナル抗体とし、他方をポリクローナル抗体として用いることもできる。

【0024】競合法としては、例えば固相に固定した抗原と測定すべき抗原とに対し、一定量の標識抗体を競争的に反応させて固相抗原・標識抗体複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、固相に結合した標識抗体の標識物質の量を測定する方法や、固相に抗体を固定し、標識抗原と測定すべき抗原とを競争的に反応させて固相抗体・標識抗原複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、固相に結合した標識抗原の標識物質の量を測定する方法を挙げることができる。

【0025】サンドイッチ法及び競合法のそれぞれにおいて、IgGをペプシンで消化して得られたF(a b')<sub>2</sub>; F(a b')<sub>2</sub>を還元して得られたFab'; 又は抗体をパインで消化して得られたFabなどの、抗原に結合する抗体フラグメントを固定して固定抗体として、また、これらを標識して標識抗体として使用することができる。

【0026】本発明の歯槽骨由来タンパクの測定方法において使用される不溶性担体としては、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、弗素樹脂、架橋デキストラン、アガロース、ポリサッカライドなどの高分子の他、紙、ガラス、金属及びこれらの組合せなどを例示することが

5

できる。不溶性担体の形状は、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管などの種々の形状であることができる。

【0027】本発明の免疫学的測定方法においては、例えばサンドイッチ免疫学的測定法等の場合に第1抗体を固定する不溶性担体として繊維状物、例えば不織布、紙等を用いる場合には、後記のいわゆるドライタイプ免疫測定法によって測定することができる。

【0028】また、不溶性担体としてポリスチレンビーズ、金属微粒子等を用いる場合には、いわゆる均一系免疫測定法(homogeneous immunoassay)によって測定することができる。

【0029】また、標識抗体の標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質及び放射性物質等を使用することができる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなどを、蛍光物質としてはフルオレセインイソチオシアネート、フィコビリプロテインなどを、発光物質としてはイソルシノール、ルシゲニンなどを、そして放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ などを使用することができ、これらは例示したものに限らず、免疫学的測定法に使用し得るものであれば、他のものでもよい。

【0030】標識剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質及び必要により発色剤が用いられる。これらの例としては、例えば、酵素として西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)等のペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素を用い、発色剤として2, 2'-アジノジー(3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸)アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、o-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン又は3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンなどを、酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、基質としてo-ニトロフェニルフォスフェートなどを、酵素として $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には基質としてフルオレセイン- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド又は4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドなどと組み合わせて用いられる。

【0031】ラテックス凝集法においては、歯槽骨由来タンパクに対する抗体を用い、検体試料中の該タンパクをラテックスに固定し、歯槽骨由来タンパクと抗体固定ラテックスによる凝集の程度により、歯槽骨由来タンパクの量を測定する。抗体は、一般にはポリクローナル抗体を用いるが、モノクローナル抗体であってもよく、この場合は、2種類以上の抗体を同一又は異なるラテックスに固定して使用する。

【0032】ドライタイプ測定法としては、例えば簡便スティック法、等のような歯槽骨由来タンパクを含む検体試料と、歯槽骨由来タンパクに対する1つの抗体(標

6

識物)をあらかじめ混合して反応させ、他のエピトープを認識する抗体を一部固定した繊維状物、紙状物等のメンブレンに、この混合溶液を通過させ、次いで洗浄液を通過させて十分洗浄し、その後、固定抗体上に歯槽骨由来タンパクを介してサンドイッチ型に結合した標識抗体の標識量を検出し、抗原量を算出する。

【0033】また、金コロイド法(Color Immuno Chromatograph Assay(CICA法))としては、歯槽骨由来タンパクを含む検体試料と、歯槽骨由来タンパクに対する抗体の金コロイド結合物とを反応させ、免疫反応の結果生じる金コロイド凝集体の色の变化で、抗原量を算出する。

【0034】

【実施例】以下、実施例、参考例により本発明を詳述するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。実施例・参考例において%表示は、特にことわらない限り重量%を示す。

【0035】

【参考例1】モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法EIAによる歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)の測定方法(WO90/09587号明細書を参照のこと)

(1)抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ(直径6mm)をよく洗浄してから、これをヒト・オステオカルシンのN末端ペプチド( $^1\text{Tyr}-^{20}\text{Arg}$ )(N20)に対するモノクローナル抗体C10n-10Bの20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を有するPBS溶液中に4 $^{\circ}\text{C}$ の温度で1昼夜放置した後、PBSで洗浄し、1%牛血清アルブミン(BSA)のPBS溶液中に、4 $^{\circ}\text{C}$ の温度で1昼夜放置してポストコーティング処理をして、C10n-10B抗体固定化ビーズを得た。なお、モノクローナル抗体C10n-10Bを産生するハイブリドーマ10Bは、工業技術院微生物工業技術研究所にFERM-3538として平成3年8月28日付で受託されている。

【0036】(2)HRP標識抗体の調製

先に本発明者らが出願したWO90/09587号の中で作成したヒト・オステオカルシンのN末端ペプチド( $^1\text{Tyr}-^{20}\text{Arg}$ )に対するポリクローナル抗体(抗Ost-N(20))の2.0 $\text{mg}/\text{ml}$ のPBS溶液1 $\text{ml}$ に、1Mの酢酸緩衝液(pH4.2)100 $\mu\text{l}$ と、40 $\mu\text{g}$ のペプシンを20 $\mu\text{l}$ の同緩衝液に溶解して加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、4時間反応させた。

【0037】反応終了後、PBSにて平衡化したセファデックスG25カラム( $\phi 2\text{cm} \times 45\text{cm}$ )を用いて分離しF(ab')<sub>2</sub>を採取した。F(ab')<sub>2</sub>の1 $\text{mg}/\text{ml}$  0.01Mリン酸、0.15M NaCl(pH7.4)溶液2 $\text{ml}$ に、MBS 10 $\text{mg}/\text{ml}$ の濃度のジメチルホルムアミド溶液50 $\mu\text{l}$ を添加し、25 $^{\circ}\text{C}$ の温度で30分間反応させた。次いでセファデッ

7

クスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液(0.1M PB)(pH6.0)でゲル濾過を行い、マレイミド化抗体と未反応MBSとを分離した。

【0038】一方、HRPの10mg/mlの0.1M PB(pH6.5)溶液2mlにS-アセチルメルカプト無水コハク酸の60mg/mlジメチルホルムアミド溶液120μlを加え、25℃で2時間反応させた。

【0039】次に0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)を800μl、0.1M EDTA160μl、1Mヒドロキシルアミン1.6mlを加え、0℃で4分間反応させた。その後、反応液をコロジオンバッグに入れ、0.1M PB(pH6.0)、5mM EDTA含有溶液を用いて、4℃で3日間透析し、チオール化HRPを得た。

【0040】次に、マレイミド化抗体2mgとチオール化HRP4mgとを混合し、コロジオンバッグを用いて氷冷下に4~10mg/mlの蛋白濃度になるまで濃縮し、15~20℃で一夜放置した。その液を、ウルトロゲルAcA44(LKB社)を充填したカラムでゲル濾過し、HRP標識抗Ost-N(20)抗体を得た。

【0041】(3) サンドイッチEIA測定系

(1)で調製したClon-10B抗体固定化ビーズ1個と、精製したヒト・オステオカルシン(標準物質)を0~20ng/mlの範囲で含有する1%BSA含有0.05M TBS(pH8.0)200μlと(2)で作成したHRP標識抗体の1%BSA含有0.05M TBS(pH8.0)溶液200μlとを、各試験管に添加して、25℃の温度で2時間インキュベートした。次に試験管内の溶液を吸引除去した後、0.05M TBS(pH8.0)で洗浄してから、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩0.02%及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5mMを含有する0.1Mリン酸/クエン酸緩衝液(pH4.3)を0.4mlずつ各試験管に加え、25℃の温度で30分間反応させた後、反応停止剤として1N硫酸水溶液を1mlずつ加えて酵素反応を停止させた。次いで、この溶液を分光光度計を用いて450nmの波長における吸収強度を測定した。これを標準物質濃度0~20ng/mlに対応してプロットした検量線を図1に示した。この結果から、本発明の測定方法を用いれば0.05ng/mlまで精度よく測定可能であることがわかる。

【0042】なお、この測定方法によって、完全ヒト・オステオカルシン(49アミノ酸残基)とそのN末端フラグメントをほぼ同じ感度で測定できた。以下の実施例で測定された検体試料中のヒト・オステオカルシンとして、完全ヒト・オステオカルシン、又はこの完全ヒト・オステオカルシンとそのN端フラグメントとの総計を、共にHOCとして表わす。

【0043】

【参考例2】

8

歯槽骨由来タンパク(TR-ACP)免疫学的測定方法 Kraenzlin, M.E. らの方法(J. Clin. Endoc. Metab. 1990, 71, 442-451)に従い測定した。すなわち、骨から、破骨細胞由来のTR-ACPを精製し、これに対する抗体を作成した。これを用いてTR-ACPの測定系を構築した。図2に示すごとく、良好な濃度依存性を示した。

【0044】

【参考例3】

10 歯槽骨由来タンパク(IGF-II)の測定系の構築

Hokken-Koelega, A.C.S.らの方法(J. Clin. Endoc. Metab. 1990, 71, 688-695)に従い測定した。すなわち、IGF-IIの抗体を採取し、これを用いてIGF-II測定系の構築を検討した。その結果を図3に示す。図3のごとく、良好な濃度依存性を示した。

【0045】

【実施例1】

歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)のモデル抽出方法

20 ヒト・オステオカルシン200ng/mlを1μlのペリオペーパーに滴下し、これによって繊維状物としての紙を用いて歯槽骨由来タンパクを採取したこととし、次いで下記A液~D液の各抽出液(各、pH7.0)を用いて浸漬することにより抽出した。

A液: 1%BSA、0.02% tween 20/PBS

B液: 1%BSA/PBS

C液: 0.02% tween 20/PBS

D液: PBS

4分間浸漬後、抽出液を100μlサンプリングして、その抽出液中のヒト・オステオカルシンの濃度(HOC ng/ml)を参考例1の方法で測定した。その結果を図4に示す。

【0046】PBSのみに比較して、B液、C液の回収率は、上昇傾向にあるが、A液が最もよい抽出効率を与えた。

【0047】

【実施例2】

抽出液のpHによる影響

40 ヒト・オステオカルシン200ng/mlを各1μlずつペリオペーパーに滴下し、抽出液のpHを5.5~8.5に変え、抽出液中のヒト・オステオカルシンの濃度(HOC ng/ml)を参考例1の方法で測定した。その結果を図5に示す。図5に示すごとく、至適pHは6.5~8.0であることが判った。

【0048】

【参考例4】

ラテックス凝集法による歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)の測定

参考例1(2)で作成した抗Ost-N(20)抗体(ポリクローナル抗体)を、ラテックスに物理吸着させ

た。ヒト・オステオカルシンの希釈系列の $50\mu\text{l}$ と、抗Ost-N(20)抗体固定ラテックスとを混合し、反応させた。その結果を図6に示す。ヒト・オステオカルシンの濃度( $\text{HOCng/ml}$ )依存的に凝集反応が起っていることが判る。

【0049】

【実施例3】

簡便スティック法による歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)の測定

ペリオペーパーをCNBrにより活性化し、これに参考例1(1)で作成した抗Ost-N(20)モノクローナル抗体(10B)を固定する。10B固定ペリオペーパーを用いて、歯肉溝滲出液を採取し、参考例1(2)で作成したHRP標識抗Ost-N(20)ポリクローナル抗体溶液に1分間浸漬する。水道水にて洗浄後、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩0.02%及び $\text{H}_2\text{O}_2$  2.5mM液に浸漬し、発色反応を3分間行う。発色した液の吸光度(450nm)を測定した。

【0050】比較として、参考例1の方法の測定法(サンドイッチEIA法)を用いた結果との相関を図7に示す。本測定系によって、簡便な測定系が正しく機能していることが判る。

【0051】

【実施例4】

金コロイド法による歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)の測定

ニトロセルロースメンブレインの検出部に、参考例1(1)で得られた抗Ost-N(20)モノクローナル抗体(10B)を固定し、金コロイド標識した参考例1(2)で作成した抗Ost-N(20)ポリクローナル抗体(Fab')<sub>2</sub>が含有された部分の末端に、検体試料を採取する部分を設計した。歯槽骨滲出液を、検体採取部分につけ、溶媒を用いて展開した。検出部にて形成された金コロイド標識抗体-抗原(ヒト・オステオカルシン)-固定抗体複合体中の抗原量( $\text{HOCng/ml}$ )を金コロイド量換算で算出した。その結果を図8に示す。図8のごとく、定量的な方法であることが示された。

【0052】

【実施例5】

歯肉溝滲出液からの歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)の採取、抽出及びその測定

各ステージの歯周疾患患者の歯肉溝滲出液をペリオペーパーを用いて採取し、実施例1のA液により抽出したものを、参考例1の測定系に供した。その結果を図9に示す。

【0053】歯周炎指数(GI)1、2、3に従って、滲出液中のヒト・オステオカルシン濃度( $\text{HOCng/ml}$ )の上昇傾向がみられ、ヒト・オステオカルシンと

歯周炎の進展との相関が示唆された。

【0054】

【実施例6】

本発明の測定方法による歯周疾患のモニタリング

実施例5と同様の方法で、初診、歯石除去(スケーリング:SC)直前、及び治療後の歯周疾患患者の歯肉溝滲出液中の歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)濃度( $\text{HOCng/ml}$ )を経時的に同時に、ポケットの深さ(PD)、歯周炎指数(GI)、アタッチメントレベル(AL)も測定した。最長4週目まで測定した。その結果を図10に示す。明らかに、治療効果を反映することが示された。

(文献1) Lamster IBら、"Enzyme activity in crevicular fluid for detection and prediction of clinical attachment loss in patients with chronic adult periodontitis." J Periodontol 1988; 59: 516-523.

(文献2) Offenbacher S ら、"The use of crevicular fluid prostaglandin Ez levels as a predictor of periodontal attachment loss." J Periodont Res 1986; 21: 101-112.

【図面の簡単な説明】

【図1】参考例1における歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)のサンドイッチ法による検量線を示す。

【図2】参考例2における歯槽骨由来タンパク(TR-ACP)の免疫学的測定方法による検量線を示す。

【図3】参考例3における歯槽骨由来タンパク(IGF-1)の免疫学的測定方法による検量線を示す。

【図4】実施例1における、歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン:  $\text{HOCng/ml}$ )のモデル抽出法による抽出結果を示す。図中、A、B、C及びDは抽出液の種類を表わし、Aは、1wt%BSA、0.02wt% tween 20/PBS、Bは1wt%BSA/PBS、Cは0.02wt% tween 20/PBSを含有し、及びDはPBSのみからなる抽出液を表わす。

【図5】実施例2における、各種pH抽出液による歯槽骨由来タンパク( $\text{HOCng/ml}$ )の抽出への影響を示す。

【図6】参考例4における歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)のラテックス凝集法による検量線を示す。

【図7】実施例3における歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)の簡便ラテックス法による測定結果と、参考例1におけるサンドイッチEIA法による検量線との相関を示す。

【図8】実施例4における歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシン)の金コロイド法による測定結果を示す。

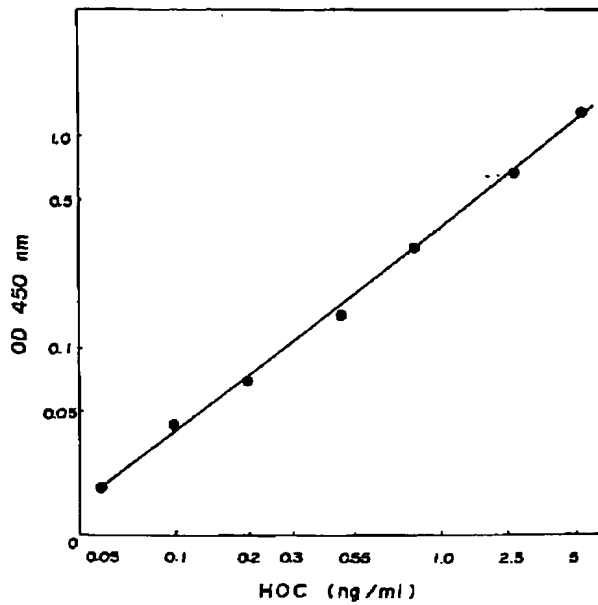
【図9】実施例5における歯周炎指数(GI)と歯肉溝滲出液中の歯槽骨由来タンパク(ヒト・オステオカルシ

11

ン) 濃度 (HOC ng/ml) の相関を示す。

【図10】実施例6における本発明の測定方法による歯周疾患のモニタリングの結果を示す。図中、実線はヒト

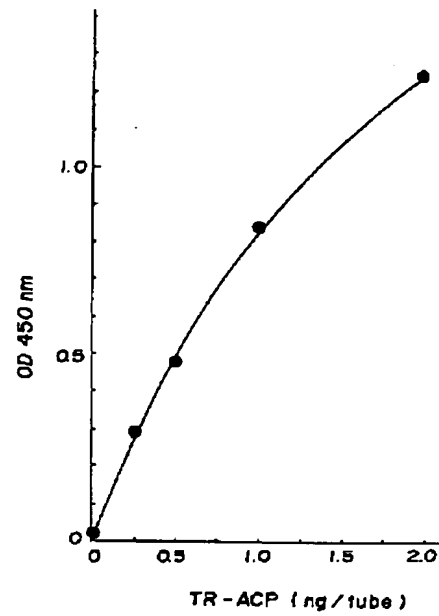
【図1】



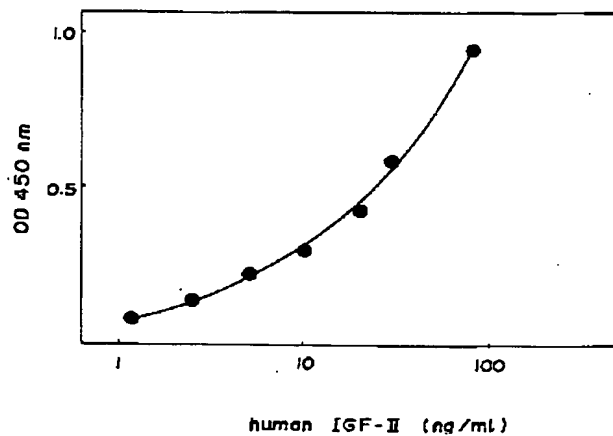
12

・オステオカルシン濃度 (HOC ng/ml) を示し、ALはアタッチメントレベル、PDはポケットの深さ、GIは歯周炎指数を示す。

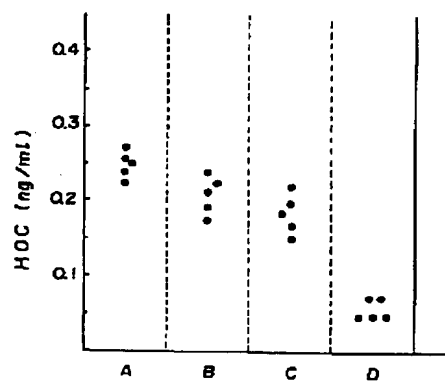
【図2】



【図3】

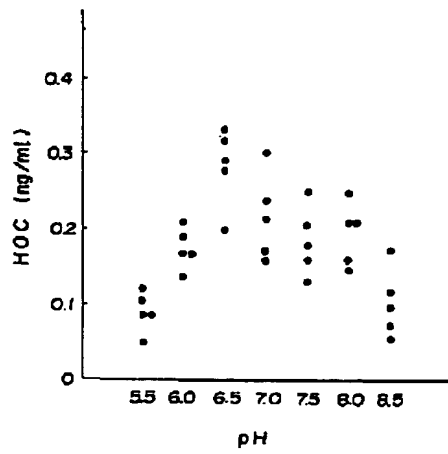


【図4】

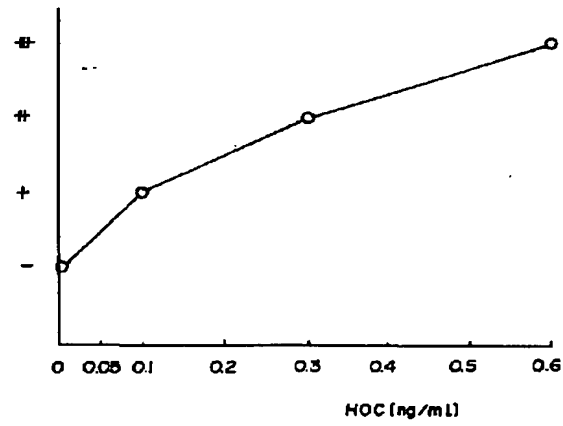




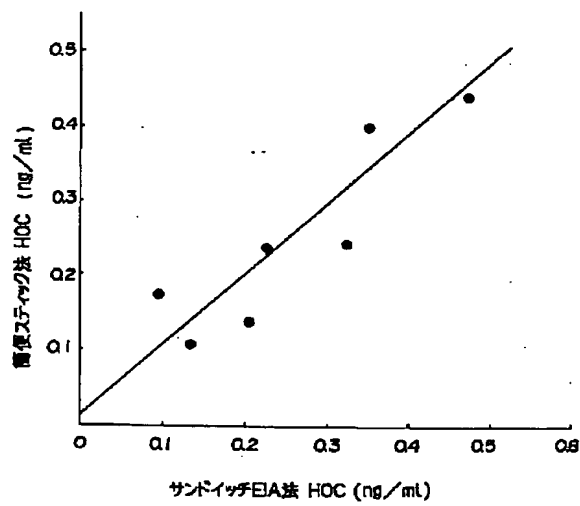
【図5】



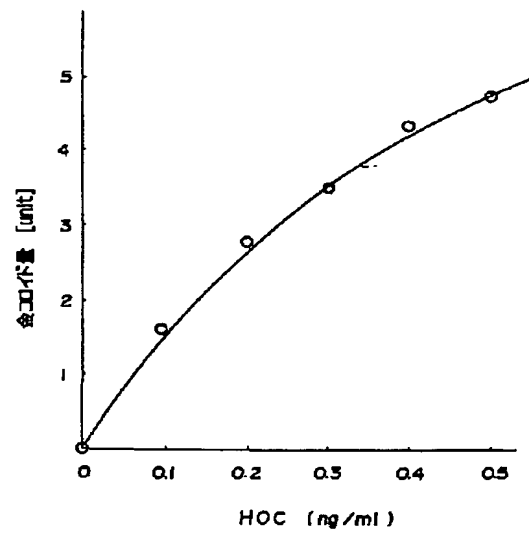
【図6】



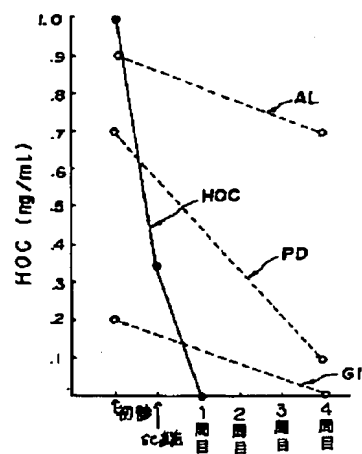
【図7】



【図8】



【图 10】



(72)発明者 中本 忠克  
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内